



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پیراپزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون

عنوان:

بررسی اثر بخشی غشای فیبرینی سلولار بر ترمیم زخم دیابتی موش صحرایی

توسط: سیده مهرناز کوهبنانی نژاد

اساتید راهنما: دکتر علیرضا فارسی نژاد - دکتر شهریار دبیری

اساتید مشاور: علی درخشانی - دکتر احمد فاطمی - دکتر نوذر نخعی

سال تحصیلی: ۱۳۹۶ - ۱۳۹۷

کد پایان نامه: ۱۰۶



Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree (MSc)

Title:

**Investigation of wound healing effect of cellular fibrin membrane on
rat diabetic model**

By:

Seyedeh Mehrnaz Kouhbanani Nejad

Supervisors:

Dr. Alireza Farsinejad

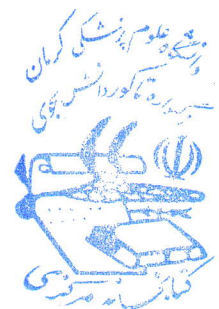
Dr. Shahriar Dabiri

Advisors:

Ali Derakhshani

Dr. Ahmad Fatemi

Dr. Nozar Nakhaei



Year:

2017

مقدمه و اهداف: در سال‌های اخیر تعداد بیمارانی که از زخم‌های دیابتی رنج می‌برند، افزایش یافته است. از همین رو در پی یافتن روش‌های درمانی جدید، جانشین‌های پوستی مورد توجه قرار گرفتند. یکی از فرآورده‌های بیولوژیکی که در این رابطه می‌تواند مؤثر باشد بیومتریال‌های فیبرینی است. فیبرین یکی از پروتئین‌های سیستم انعقادی است که در روند ترمیم زخم‌هایی که با خونریزی همراه هستند، نقش به‌سزایی دارد. استفاده از بیومتریال‌های فیبرینی به دلایل مختلف در مقایسه با بیومتریال‌های سنتتیک ارجحیت دارد از جمله این موارد عدم ایجاد عارضه به دلیل امکان تهیه آن به صورت اتولوگ، تجزیه پذیری، قابلیت پلیمریزه شدن و خاصیت چسبندگی است. محققان معتقدند که ترمیم زخم‌ها با جانشین‌های پوستی حاوی سلول‌های زنده، سریع‌تر، بهتر و با فیبروز کمتری صورت می‌گیرد. با توجه به اینکه اختلال عملکرد فیبروبلاست‌ها یکی از مکانیسم‌های اصلی است که موجب تأخیر و یا عدم بهبود در زخم‌های دیابتی می‌گردد. در این تحقیق نوعی فرآورده بیولوژیک با استفاده از فیبرین و فیبروبلاست‌های آلوژن موشی تهیه کردیم که به عنوان غشا فیبرینی سلولار، جهت ترمیم زخم دیابتی در مدل حیوانی مورد استفاده قرار گرفت.

روش‌ها: ابتدا فیبروبلاست‌ها با استفاده از کشت اولیه سلولی از پوست یک عدد موش صحرایی جدا و با رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی ویمنتین تأیید شدند. سپس غشای فیبرین با استفاده از FFP ساخته شد و فیبروبلاست‌ها بر روی غشای فیبرینی کشت داده شدند. جهت تأیید حضور فیبروبلاست‌ها بر روی غشای فیبرین، آن‌ها با رنگ فلورسنت رنگ آمیزی شده، بر روی غشا کشت داده و سپس با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند. در این تحقیق از ۳۶ عدد موش صحرایی نر از نژاد Wistar با وزن ۲۵۰-۳۰۰ g استفاده گردید. دیابت با یک بار تزریق استرپتوزوتوسین به شکل داخل صفاقی در موش‌ها ایجاد گردید. سپس زخم‌هایی به قطر ۱/۵ سانتی‌متر با برداشتن کامل پوست در ناحیه پشت موش‌ها ایجاد

شد موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به سه گروه: کنترل تگادرم، غشا فیبرین به همراه تگادرم، غشا فیبرین سلولار (فیروبلاست) به همراه تگادرم تقسیم شدند. فتوگرافی زخم در روزهای ۰، ۷، ۱۰ و ۱۴ انجام شد. همچنین بررسی‌های هیستوپاتولوژی شامل رنگ آمیزی H&E، Masson's Trichrome و ایمنوهیستوشیمی با مارکر CD31 در روزهای ۰، ۷، ۱۰ و ۱۴ انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که زخم‌ها در گروه غشای فیبرینی سلولار به صورت معناداری سریع‌تر بسته شدند. همچنین درصد تشکیل اپیتلیال در روزهای ۰، ۷، ۱۰ و ۱۴ و درصد تشکیل کلاژن در همه روزها در این گروه به صورت معناداری بیشتر از دو گروه دیگر بود. در گروه غشا فیبرینی سلولار، درصد فیروبلاست‌ها در روزهای ۳ و ۷ به صورت معناداری بیشتر و در روز ۱۰ به صورت معناداری کمتر از دو گروه دیگر بود. همچنین درصد آنژیوژنز در روز ۷ و درصد سلول‌های ماکروفاژ در روزهای ۰، ۷، ۱۰ و ۱۴ در این گروه به صورت معناداری کمتر از سایر گروه‌ها بود. درصد نوتروفیل‌ها در سه گروه تفاوت معناداری را در هیچ یک از روزها نشان نداد.

نتیجه‌گیری: غشای فیبرینی سلولار با فیروبلاست‌های آلژن با انتقال مؤثر فیروبلاست‌ها به محل زخم، باعث ترمیم سریع‌تر و بهتر زخم در موش‌های صحرایی دیابتی می‌گردد.

کلید واژه‌ها: فیروبلاست، غشای فیبرینی، موش صحرایی دیابتی، ترمیم زخم

Abstract:

Background & Objectives: The number of patients suffering from diabetic ulcers has been increased in recent years. As a result, new treatments were introduced as skin substitutes. In this regard, one of the effective biological products is fibrin biomaterial. Fibrin is one of the coagulation proteins that plays an important role in the healing process of hemorrhagic wounds. The application of fibrin biomaterials is more preferable than synthetic biomaterials due to a variety of reasons including, the absence of complications (because of the possibility of autologous preparation), degradability, polymerization and adhesion properties. Researchers believe that wound healing is faster, better and less fibrous in skin substitutes containing living cells. Dysfunction of fibroblasts is one of the main mechanisms that causes delay or lack of healing in diabetic wound. In this study, we developed a biological product using fibrin and allogeneic rat fibroblasts and used it as a cellular fibrin membrane for diabetic wound healing in an animal model.

Methods: First, fibroblasts were isolated from a single rat using primary cell culture and were confirmed by immunocytochemical staining for Vimentin. Second, fibrin membranes were made by FFP and then fibroblasts were cultured on fibrin membranes. To confirm the presence of fibroblasts on the fibrin membrane, they were stained with a fluorescent dye, then were cultured on membrane and examined by fluorescence microscope. In this research, 36 Wistar male rats weighing 250-300 g were used. Diabetes was induced by intra-peritoneal injection of streptozotocin in rats. Then full thickness wounds, with a diameter of 1.5 cm, were made dorsally. Rats were randomly divided into three groups: Tegaderm control, Fibrin membrane with Tegaderm and Fibrin cellular membrane (fibroblast) with Tegaderm. The wounds were photographed on days 0, 7, 10 and 14. Histopathological examinations, including H & E staining, Masson's Trichrome and immunohistochemistry with CD31 marker were performed on days 3, 7, 10 and 14.

Results: The results showed that wound closure was significantly faster in the cellular fibrin membrane group. In this group, the percentage of epithelial formation on days 7, 10 and 14, and the percentage of collagen formation on all days were significantly higher than the other two groups. In cellular fibrin membrane group, percentage of fibroblasts was significantly higher on days 3 and 7 and it was significantly less than the other two groups on day 10. The percentage of angiogenesis on day 7 and the percentage of macrophage cells on days 7, 10 and 14 were significantly lower than other groups. The percentage of neutrophils in the three groups did not show any significant difference on any of the days.

Conclusion: Cellular fibrin membrane with allogeneic fibroblasts transfer fibroblasts to the wound site effectively and leads to faster and better wound healing in diabetic rats.

Key words: Fibroblasts, Fibrin membrane, Diabetic rats, Wound healing